研究用試薬　　2014年3月3日 改定

『 レビス® KLH(TDAR)ラット-IgM ELISA KIT 』取扱説明書

この度は弊社製品をご購入いただきましてありがとうございます。ご使用に際してはキットに同梱された取扱説明書のみに従って測定を実施して下さい。なお、操作法は弊社 Webサイト[良い結果を出すためのポイント(動画)]、並びに[Q&A] (キットの蓋を開けた際に一番上にあるカード(13×10cm)に記載されたパスワードをご利用下さい)をご参照下さい。

1. 使用目的

本キットはラット抗 KLH(Keyhole limpet hemocyanin)-IgM 抗体価を定量的に測定するための酵素免疫測定法です。

本キットは研究のみにご使用下さい。

特長

●全反応時間は 2 時間20 分です。
●ラット血清または血漿中のラット抗 KLH-IgM 抗体価を測定します。
●微量な検体で測定可能です。
●1 キットは 96 ウエルです。
●標準品はラット由来のものです。
●全ての試薬は溶液タイプです。

2. キットの保存と使用期限

キットは 2～8℃で保存して下さい(凍結厳禁)。この保存条件下でキットは製造月から6 ヵ月(外箱のラベルに記載)までは安定です。有効期限の過ぎた試薬は使用しないで下さい。開封した各試薬につきましては、保管状態により影響を受ける可能性がありますので早めのご使用を推奨します。

3. イントロダクション

医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン ICH S8 では、免疫毒性の標的が特定されていない場合には T 細胞依存性抗体産生試験(TDAR、T cell Dependent Antibody Reaction)が推奨されています。TDAR は、T 細胞依存性抗原とされている、たとえば KLH (Keyhole limpet hemocyanin)を投与して一次抗原刺激によるIgM 性抗体の産生、更に二次抗原刺激後のクラス・スイッチによるIgG 性抗体の産生を観察します。本キットはラット血液中の IgM 性の抗 KLH 濃度を簡単に測定できるもので、上記の目的には最適です。抗 KLH-IgM 測定キットと併せてご使用下さい。

4. 測定原理

本キットは標準品、希釈検体をKLH 固相化マイクロプレートウエル中でインキュベートします。1 時間のインキュベーションと洗浄後、HRP(ペルオキシダーゼ)結合抗ラット IgM 抗体を加え、捕捉されたラット抗 KLH-IgM抗体とともに1時間インキュベートします。再度の洗浄後、ウエルに残ったHRPを発色液(TMB)と反応させます。反応は酸性の溶液の添加で停止され、反応の結果生じた黄色の産物が 450nm(副波長620nm)で比色測定されます。吸光度はラット抗 KLH-IgM 抗体価にほぼ比例します。標準品濃度に対して吸光度をプロットし標準曲線を作製し、この標準曲線から未知検体中の濃度が決定されます。

5. 注意事項

●本キットは ELISA 法の研修を終了した方、または指導者の下でご使用下さい。
用手法操作で測定する際にはピペッティング操作の再現性が安定した方がご使用下さい。
●準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につけて下さい。
●試薬類を皮膚に付けないで下さい。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で充分に洗い流す等の応急処置を行い、必要な場合は医師の手当てを受けて下さい。
●本キットを使用している場所では飲食や喫煙をしないで下さい。
●検体は感染の危険性があるものとして充分注意して取り扱って下さい。本キットは動物由来の成分を含んでいます。
●使用済みの検体、使用した消耗品等は1%ホルマリン、2%グルタールアルデヒドまたは0.1%以上の次亜塩

素酸ナトリウム溶液に1時間以上浸けて下さい。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄して下さい。使用した消耗品や未使用の薬品類は所属施設の規定並びに各地域の法令に従って廃棄して下さい。

●試薬類は口でピペッティングしないで下さい。

●ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。

●各ステップでの静置反応時には、ウエルの乾燥、異物の混入、温度の偏り、分注試薬の蒸発を防止する為、必ずプレートシールを貼って下さい。

●ELISA法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温：20～25℃（実験台上またはインキュベータ内温度）を厳守して下さい。また、風速（エアコン風も含む）：0.4m/sec（*①）以上、湿度30%未満の環境下での測定は避けて下さい（9. 技術上のヒントをご参照下さい）。

（*①）風速 0.4m/sec の目安は弊社 Web サイトの動画「反応条件」をご参照下さい。

6. 構成品

構　成　品	状　態	容　量
(A) KLH固相化96ウエルプレート	洗浄後使用	96 wells（8×12）／1枚
(B) 抗 KLHラットIgM標準溶液（1,000 ng/ml）	希釈後使用	200μl／1本
(C) 緩衝液	そのまま使用	100ml／1本
(D) HRP結合抗ラットIgM抗体	希釈後使用	100μl／1本
(F) 発色液（TMB）	そのまま使用	12ml／1本
(H) 反応停止液（1M H_2SO_4） ※取扱注意	そのまま使用	12ml／1本
(I) 濃縮洗浄液（10×）	希釈後使用	100ml／1本
プレートシール		3枚
取扱説明書		1部

7. 添付されていないが必要な器具 □チェックリスト

□精製水（蒸留水） □標準溶液希釈用試験管

□洗浄液希釈用ガラス器具（メスシリンダー・ビーカー・瓶） □チップ交換型ピペット（使い捨てチップで 10～20μl を正確にピペッティングできるもの、及び 50～500μl を正確にピペッティングできるもの）

□連続分注ピペット（例 Eppendorf の multipette plus）、50μl を連続分注できるもの □ペーパータオル等の吸水性のあるもの（洗浄後にプレートに残った液を取り除く） □撹拌器（Vortex タイプ） □マイクロプレート振とう器（約 600～1,200 rpm） □96 ウエルプレート用洗浄機（あれば好ましい）または噴射ビン（弊社 Web サイトの動画「洗浄操作」をご参照下さい。） □96 ウエルプレートリーダー（450 ±10 nm 、620nm：600～650nm） □データ計算用ソフトウェア

8. 試薬の調製

＊キットの試薬は使用前に必ず室温（20～25℃）に戻して下さい（2 時間位が目安です）。

＊6. で「そのまま使用」とある試薬は室温化後そのままの状態で使用できます。「希釈後使用」とあるものについては下記の要領で調製して下さい。

＊測定に必要な分だけ試薬を調製して下さい（ご不明な際にはお問い合わせ下さい）。

【濃縮された試薬類】

[（B）抗 KLH ラットIgM 標準溶液（1,000 ng/ml）]：標準曲線作製用

（B）抗 KLH ラットIgM 標準溶液（1,000 ng/ml）（原液）と（C）緩衝液を使って標準溶液を調製して下さい。下記は一例です。

標準溶液の容量	緩衝液	濃度（ng/ml）
原 液 100μl	400μl	200
200 ng/ml溶液 200μl	200μl	100
100 ng/ml溶液 200μl	200μl	50
50 ng/ml溶液 200μl	200μl	25
25 ng/ml溶液 200μl	200μl	12.5
12.5 ng/ml溶液 200μl	200μl	6.25
6.25 ng/ml溶液 200μl	200μl	3.13
0（ブランク）	200μl	0

［(D)HRP 結合抗ラットIgM 抗体］
100μl を充分分取できる量をご提供しています。濃縮液を(C)緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。
［(I)濃縮洗浄液(10×)］
濃縮洗浄液(10×)を室温化された精製水(蒸留水)で 10 倍に希釈して下さい。
例:100ml の濃縮洗浄液(10×)＋900ml の精製水(蒸留水)(96 ウエル全てを使用する場合)

【試薬の安定性と保存方法】

(A)KLH 固相化 96 ウエルプレート
未使用(冷蔵状態を保った状態でシールを剥がしていない)KLH 固相化ストリップは同梱のジップシールパックに戻し、そのまま 2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(B) 抗 KLH ラットIgM 標準溶液(1,000 ng/ml)
キットを分割して使用する際は使用する直前に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。希釈した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないで下さい。

(C)緩衝液及び(F)発色液(TMB)
一部の溶液を使用する際は必要量より少し多めの量を別の容器に移し、残りは室温に戻さないで直ちに蓋をしっかり閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(D)HRP 結合抗ラットIgM 抗体
キットを分割して使用する際は希釈時に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

(H)反応停止液(1M H_2SO_4)
使用残りを保存する場合は蓋をしっかりと閉め2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

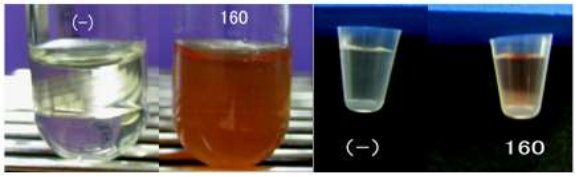
(I)濃縮洗浄液(10×)
濃縮洗浄液(10×)を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

9. 技術上のヒント

●検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけて下さい。1 ウエル/1 チップのご使用をお薦めします。
●発色液は 96 ウエルプレートに使用するまではほぼ無色または薄い青色澄明です。光を避けて保存して下さい。
●反応停止液は使用するまでは無色です。
●やむを得ず、測定操作を、風速:0.4m/sec 以上、湿度 30%未満の環境下で実施する場合には、各ステップの静置反応時、プレートシールをすることに加え、下記のような方法をご検討下さい。
例)インキュベータ内、発泡スチロール製箱内で静置反応させる等。測定室の環境条件により対策方法が異なる場合がありますので、詳細を弊社 Web サイトの動画「反応条件」でご確認下さい。

10. 検体の調製

本キットはラット血清または血漿中のラット抗 KLH-IgM 抗体価を測定します。
●検体は定法にしたがって採取しすぐに測定するか、－35℃以下で凍結保存して下さい。凍結した検体は測定する直前に解凍し充分に撹拌して下さい。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。正しい結果が得られない原因になります。
●溶血した検体や高脂質検体は異常値の発生原因となりますので避けて下さい。
※血液成分の影響(高脂質・溶血等)を抑制する為に原検体中の脂質(乳ビ)・溶血が次項写真より高い場合は異常値発生の原因となる場合がありますので測定に使用しないで下さい。
本キットの場合、溶血は160mg/dL以上で影響が現れます。



正常検体　溶血検体 160mg/dL　正常検体　溶血検体 160mg/dL

正常検体　乳ビ検体（高脂質検体）　正常検体　乳ビ検体（高脂質検体）

●採血の際にヒト用の採血管をご使用になるのは避けてください。血清分離促進剤等の添加剤が測定系に影響を与える可能性が考えられます。

●濁り及び不溶物のある検体は遠心分離等で除去後測定に用いて下さい。

●妨害物質の影響が疑わしい検体は、同一検体において、異なる2 ポイント以上の希釈率で希釈直線性を確認して下さい。

●非特異反応を回避するため、**検体は必ず 200 倍以上に希釈して下さい。**抗体価により異なりますが検体希釈目安は 200～20,000 倍です。標準曲線内に入るよう希釈調製して下さい。検体の希釈倍率は、免疫・採血条件により異なります。検体を希釈する場合はあらかじめ試験管等を用いて緩衝液で希釈し測定ウエルに分注して下さい。

検体希釈の一例	プレ希釈(20 倍)	200倍	2,000倍	20,000倍・・・・
検体(μl)	10	20*	20*	20*
緩衝液(μl)	190	180	180	180

註)*ひとつ低倍率の希釈検体

【検体の安定性と保存方法】

検体は採取後すぐに測定するか、1 週間以内に測定する場合は 2～8℃で保存して下さい。また、長期に保管する場合は、-35℃以下での凍結保管を推奨します。また、検体の希釈は用時調製として下さい。

11. 測定操作法

洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意して下さい。

KLH 固相化プレートのシールは、プレートが充分に室温に戻ってから剥がして下さい。

(1) あらかじめ調製した洗浄液を各ウエルに満たし、3 回洗浄(*②)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。

(2) 検体測定ウエルに希釈調製済み検体を**50μl** ずつ分注します。

(3) 標準品測定ウエルに各濃度の標準溶液を**50μl** ずつ分注します。

(4) マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌(*③)します。

(5) プレートシールを貼り、室温(20～25℃)で 1 時間静置(＊④)します。

(6) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし、3回洗浄(*②)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。

(7) 各ウエルにHRP 結合抗ラットIgM 抗体を**50μl** ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌します。

(8) プレートシールを貼り、室温(20～25℃)で 1 時間静置(＊④)します。

(9) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし 3 回洗浄(*②)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。

(10) 各ウエルに発色液を **50μl** ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌(*③)します。

(11) プレートシールを貼り、室温(20～25℃)で 20 分間静置(＊④)します。

(12) 各ウエルに反応停止液を**50μl** ずつ分注し、発色反応を停止します。

(13) 撹拌(*③)後マイクロプレート用分光光度計で 450nm(副波長 620nm)での吸光度を測定します。副波長は 600～650nm の範囲で使用できます。

(＊②)、(＊③)、(＊④)測定手順概要(7 ページ)をご参照下さい。

ワークシート(例)

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	200 ng/ml	検体1	検体9	検体17	検体25	検体33
B	100 ng/ml	検体2	検体10	検体18	検体26	検体34
C	50 ng/ml	検体3	検体11	検体19	検体27	検体35
D	25 ng/ml	検体4	検体12	検体20	検体28	検体36
E	12.5 ng/ml	検体5	検体13	検体21	検体29	検体37
F	6.25 ng/ml	検体6	検体14	検体22	検体30	検体38
G	3.13 ng/ml	検体7	検体15	検体23	検体31	検体39
H	0	検体8	検体16	検体24	検体32	検体40

12. 計算

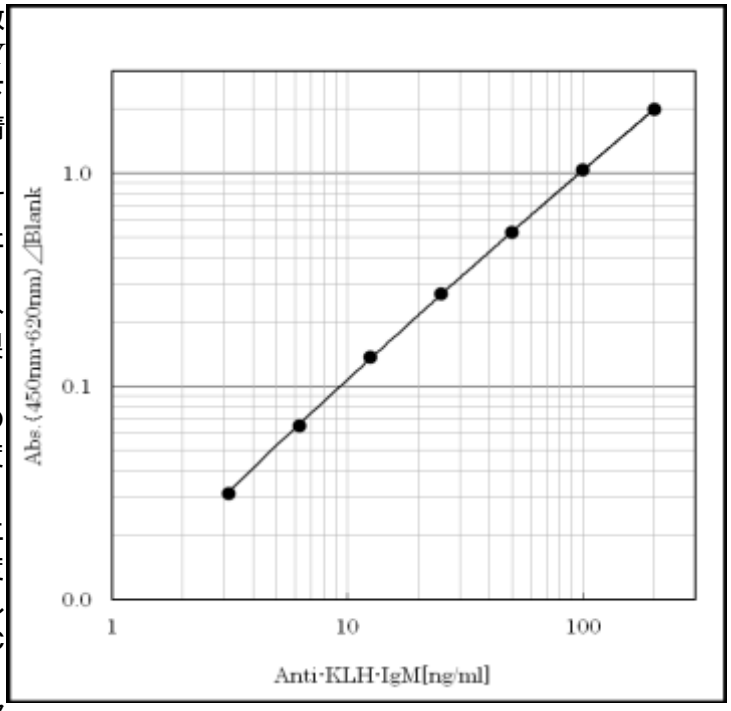
(1)測定毎に標準曲線を作製します。両軸対数を使用し X 軸を標準溶液濃度(ng/ml)、Y 軸を吸光度の標準曲線グラフを作製して下さい。標準曲線は弊社 Web サイト「技術情報」「ELISA の標準曲線」をご参照下さい。

(2)標準曲線より、希釈検体の吸光度に対応する濃度(ng/ml)を読み取ります。読み取った濃度に検体希釈率を乗じ測定値とします。

＊検体の吸光度が標準曲線吸光度より外れた場合は(C)緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定を実施して下さい。

＊一番高濃度の標準溶液の吸光度付近の検体は緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定することをお薦め致します。

(3)反応温度が高い場合、吸光度が全体的に高くなります。測定機器によりますが吸光度の信頼性のない領域の標準曲線は使用しないで下さい。また、反応温度を20～25℃範囲内にして再測定を実施して下さい。



＊コンピュータソフトでの演算処理では、3 次多項式または 4 パラメーターの使用をお薦め致します。

＊ラットの臨床所見は臨床症状や他の検査結果などを総合的に判断して行う事が必要です。

右上のグラフは標準曲線例です(吸光度は、測定環境により変動します)。

13. キットの性能

●測定範囲

ラット抗 KLH-IgM 抗体価を3.13～200 ng/ml の範囲で測定できます。

●特異性

この ELISA 系で使用されているHRP 結合抗ラットIgM 抗体はラットIgM に対して特異的です。

ラットIgG との交差性は ELISA レベルでバックグラウンド以下です。

●精度試験(アッセイ内変動)(5 重測定、2 検体)　　平均 C.V. 値は 5%未満

●再現性試験(アッセイ間変動)(4 重測定、3 検体、4 日間)　平均 C.V. 値は 5%未満

●添加回収試験

2血清検体に異なる3濃度のラット抗 KLH-IgM 抗体を添加し測定した結果、回収率は94.8%から102%でした。

●希釈直線性

2血清検体を連続的に希釈用緩衝液で3段階希釈し測定した結果、直線回帰の R^2 は0.998と0.999 でした。

14. トラブルシューティングと Q&A

●すべてのウエルでの反応が弱い

可能な解釈

1)標準品や検体の入れ忘れ。
2)発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
3)発色に関連する試薬溶液の取り違えや希釈調製不良。
4)酵素阻害剤の混入。
5)キット保管温度の影響(凍結した場合)。
6)プレートの過剰な洗浄。
7)発色液の温度が低かった。

●最小標準溶液濃度(3.13 ng/ml)の OD 値よりブランクOD 値が高くなる。

可能な解釈

洗浄が不適当、不完全であった。
（ペルオキシダーゼ・アビジン結合物と反応後の洗浄回数 3 回を同じ流速で 4～6 回に増やして下さい。）

●変動係数（CV）が大きい

可能な解釈

1）洗浄が不適当、不完全であった。
2）標準品や管理血清、または検体の撹拌が不充分であった（凍結検体の撹拌は充分に行って下さい）。
3）ピペッティング操作が一定ではなかった。

●Q-1 ：キットは分割して使用することができますか？
A-1 ：できます。プレートに貼られた透明シールをストリップの間にそってカッターなどで切り離してご使用下さい。使用しないプレートはシールを貼った状態で冷蔵庫に保管して下さい。

●Q-2 ：プレートを取り出したらウエルの中に液体が入っていましたが何ですか？
A-2 ：出荷時には保存安定液が充填してあります。

●更に詳しいトラブルシューティングやQ&A は弊社ホームページをご覧下さい。

【測定手順概要とチェックリスト】

必ず取扱説明書を一読して検体条件、測定条件、測定方法を確認後測定操作を行って下さい。

操作法は弊社Webサイト[良い結果を出すためのポイント(動画)]並びに「Q&A」をご参照下さい。

- □ ウエルプレート、試薬類を充分に室温(20～25℃)に戻して下さい。室温化には2時間位必要
- □ 濃縮洗浄液の希釈　：室温化された精製水で、10倍に希釈して下さい。
- □ 標準溶液の希釈(例)：室温化された緩衝液で、希釈して下さい。

希釈例

濃度(ng/ml)		200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	0
標準溶液(μl)	原液:100		200*	200*	200*	200*	200*	200*	0
緩衝液(μl)		400	200	200	200	200	200	200	200

*：ひとつ高濃度の標準溶液

			各操作注意事項並びに関連情報
□	**KLH固相化96ウエルプレート**		
□	↓洗浄3回 （＊②）		洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
□	**希釈検体または抗KLHラットIgM標準溶液**	**50μl**	「ピペッティング」の動画参照
□	↓撹拌(＊③)、室温(20～25℃)、1時間反応、静置(＊④)	⇨	第一反応「反応条件」の動画参照
□	HRP結合抗ラットIgM抗体の希釈 室温化された緩衝液で、100倍に希釈して下さい。		希釈溶液の調製は第一反応中に行う
□	↓洗浄3回(＊②)		洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
□	**HRP結合抗ラットIgM抗体**	**50μl**	「ピペッティング」の動画参照
□	↓撹拌(＊③)、室温(20～25℃)、1時間反応、静置(＊④)	⇨	第二反応「反応条件」の動画参照
□	↓洗浄3回(＊②)		洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
□	**発色液(TMB)**　TMBが室温化されていることを確認	**50μl**	分注後、濃度により青色に変色
□	↓撹拌(＊③)、室温(20～25℃)、20分間反応、静置(＊④)	⇨	第三反応「反応条件」の動画参照
□	**反応停止液(1M H_2SO_4)**　強酸性につき取扱注意	**50μl**	分注後、濃度により黄褐色に変色
□	↓撹拌(＊③)		直ちに撹拌
□	**吸光度測定(主波長450nm、副波長620nm:600～650nm)**		副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします

（＊②）**洗浄液をウエルに分注後、手のひらの上で10秒ほど軽く振り廃棄します。**3回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後の乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は300μl／ウエルです。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は5～25ml／分（ノズルの径により異なります）です。第一反応後の初回の洗浄のみウエル間のコンタミに注意して下さい。「洗浄操作」の動画をご参照下さい。

（＊③）撹拌の目安は600～1,200rpm-10秒間、3回。「撹拌操作」の動画をご参照下さい。

（＊④）撹拌終了後プレートシールを貼って静置して下さい。「反応条件」の動画をご参照下さい。
プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けて下さい。一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。

ワークシート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

【測定名】 _____

【所属】 _____

【測定者】 _____ 【測定日】 _____

【キットロット番号】 _____ 【有効期限】 _____

【備考】 _____

_____

_____

_____

_____

_____

【製品名】 ; レビス® KLH(TDAR)ラット-IgM ELISA KIT

【コード番号】 ; AKRKM-010

【英語表記】 ; Anti-KLH(TDAR)Rat-IgM ELISA KIT(AKRKM-010, Shibayagi, Gunma, Japan)

【お問い合せ先】

製造／発売元；株式会社 シバヤギ

〒377-0007 群馬県渋川市石原 1062-1

TEL. 0279-25-0279 FAX. 0279-23-0313

<E-mail>syc-info@shibayagi.co.jp
<URL>http://www.shibayagi.co.jp